

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 29 407.0
Anmeldetag: 29. Juni 2002
Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH,
Mannheim/DE
Bezeichnung: Verfahren zur Einstellung der System-
parameter eines Rastermikroskops
IPC: G 02 B 21/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 20. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Walter

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

A 91
06/00
EDV-L

BEST AVAILABLE COPY

"Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines Rastermikroskops"

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Einstellung der
5 Systemparameter eines Rastermikroskops, vorzugsweise eines konfokalen
Rastermikroskops, wobei die mit dem Rastermikroskop durchgeführte Bildauf-
nahme eines Objekts von einem Steuerrechner gesteuert wird.

Die Erfindung bezieht sich auf den Bereich der Rastermikroskopie,
10 insbesondere auf den Bereich der konfokalen Rastermikroskopie.
Rastermikroskope sind seit Jahren aus der Praxis bekannt. Lediglich
beispielhaft wird hierzu auf die DE 196 54 211 A1 verwiesen.
Rastermikroskope im Sinn der vorliegenden Erfindungen sind weiterhin alle
Mikroskoptypen, die eine rasternde Bilddetektion bzw. Bildaufbau aufweisen.
15 Steuerrechner für solche Rastermikroskope sind üblicherweise Personal-
Computer, die spezielle Schnittstellen zur Ansteuerung der Mikroskop-
Hardware aufweisen. Steuerrechner im Sinn der vorliegenden Erfindung
können auch Einplatinen-Computer, spezielle in das Rastermikroskop
integrierte Computer-Hardware oder ein ganzes Computer-Cluster sein.
20 Computer-Cluster dienen nicht nur zur Steuerung des Rastermikroskops
sondern auch zur Durchführung weiterreichender rechenintensiver
Operationen, wie beispielsweise die Visualisierung mehrdimensionaler

Bilddaten. Die mit einem konfokalen Rastermikroskop aufgenommenen Bilddaten umfassen üblicherweise zweidimensionale Bilddaten, sogenannte optische Schnitte eines Objekts. Je nach Aufgabenstellung werden auch dreidimensionale Bilddatensätze oder eindimensionale Linescans durchgeführt, wobei das Objekt mit Licht einer oder mehreren Lichtquellen gegebenenfalls unterschiedlicher Wellenlängen konfokal beleuchtet wird. Im Fall der Fluoreszenzmikroskopie sind Ein- oder Mehrphotonenanregungsprozesse der Fluoreszenzmarkierungen bzw. -objekte üblich.

10 Insbesondere konfokale Rastermikroskope erfordern vom Anwender hinreichende Kenntnis über die Bedienung eines solchen Rastermikroskops, nämlich zur Einstellung der voneinander abhängigen und oftmals auch einander entgegenwirkenden bzw. einander ausschließenden Systemparameter. Dazu gehören der Pinholeldurchmesser der konfokalen Detektor-
15 einheit, die Hochspannung des Photomultiplier (PMT) der Detektoreinheit, die Laserleistung, etc. Zur optimalen Einstellung der Systemparameter, insbesondere unter Berücksichtigung objektspezifischer Eigenschaften, muss der Benutzer auf seine Erfahrungen mit dem Umgang solcher Rastermikroskope zurückgreifen. Jedenfalls ist es für einen Benutzer bislang
20 kaum möglich gewesen, optimale Aufnahmevergebnisse ohne umfassende einschlägige Erfahrung erzielen zu können.

Aufgrund der voranstehend genannten Komplexität bei der Einstellung konfokaler Rastermikroskope werden die Betriebs- bzw. Systemparameter bei
25 Rastermikroskopen von zahlreichen Benutzern nicht optimal eingestellt. Vor allem die Unkenntnis der teilweise sehr komplizierten Zusammenhänge verschiedener optischer und elektronischer Randparameter eines konfokalen Rastermikroskops sind die Ursache für eine bislang unzureichende Bedienung. Erfolgt die Einstellung eines solchen Rastermikroskops aber nicht
30 optimal, so lässt sich eine Bildaufnahme nur mit reduzierter Bildqualität oder einer viel zu langen Einstellungsprozedur vor der eigentlichen Bildaufnahme vornehmen. Eine zu lange Einstellungsphase vor der eigentlichen Bildaufnahme reduziert jedoch die Effizienz eines solchen Mikroskops und führt meist zu einem übermäßigen Verschleiß der Laserlichtquelle und/oder

der mit dem Laserlicht beaufschlagten Lichtleitfasern sowie möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der Probe.

Die bislang aus der Praxis bekannten Rastermikroskope sind insbesondere
5 auch beim Einlernen neuer Benutzer problematisch, da stets Anweisungen und Hilfestellungen erfahrener Benutzer erforderlich sind. Jedenfalls ist es bislang schwierig, die optimale Nutzung eines Rastermikroskops autodidaktisch zu erlernen. Vielmehr ist bei bisherigen Rastermikroskopen eine äußerst lange Einlernphase mit der Hilfestellung erfahrener Benutzer
10 zwingend erforderlich.

Ein weiteres Problem aus der bisherigen Praxis ist darin zu sehen, dass zahlreiche Fluoreszenzobjekte bei sehr langen Einstellungsphasen ausbleichen. Da jedoch lange Einstellungsphasen meist nicht auszuschließen
15 sind, ist die Anwendung der aus der Praxis bislang bekannten Rastermikroskope insbesondere bei biologischen Proben eingeschränkt und insoweit problembehaftet. Grundsätzlich gilt es daher, die Zeitdauer zur optimalen Einstellung ganz erheblich zu reduzieren.

20 Angesichts der voranstehend genannten Probleme liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines Rastermikroskops anzugeben und weiterzubilden, bei dem ein Benutzer wenig oder sogar keine technischen Kenntnisse über die Auswirkungen der einzustellenden Systemparameter benötigt und dass die
25 Systemparameter für den Benutzer möglichst einfach einzustellen sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren der gattungsbildenden Art löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist ein solches Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass nach einer
30 Bildaufnahme des Objekts von einem Benutzer mindestens ein Bildqualitätsmerkmal eingegeben wird, das von dem Steuerrechner in

mindestens einen verändert einzustellenden Systemparameter des Rastermikroskops umgerechnet wird.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, dass beispielsweise die Einlernphase 5 zur Bedienung eines Rastermikroskops für einen unbedarften Benutzer sich erheblich verkürzen lässt, wenn der Benutzer anhand eines zunächst aufgenommenen Objektbilds dem Steuerrechner eingibt, inwieweit er dieses bei einer nachfolgenden Bildaufnahme verändert haben möchte. Hierzu ist es 10 in besonders vorteilhafter Weise nicht erforderlich, dass der Benutzer die Systemparameter unmittelbar eingibt oder die technischen Wirkungen der Systemparameter des Rastermikroskops genau kennt bzw. erlernt. So gibt der Benutzer beispielsweise vor, dass das neu aufzunehmende Bild "heller" oder "schärfer" sein soll. Durch diese Eingabe eines Bildqualitätsmerkmals wird 15 sodann mindestens ein verändert einzustellender Systemparameter des Rastermikroskops errechnet und eine erneute Bildaufnahme bei verändertem Systemparameter des Rastermikroskops kann erfolgen. Bei der Umrechnung der Bildqualitätsmerkmale in Systemparameter werden inverse Rechenoperationen ausgeführt, wobei die technischen Zusammenhänge zwischen Systemparametern und Bildqualitätsmerkmalen berücksichtigt werden. So 20 wird errechnet, welche Systemparameter des konfokalen Rastermikroskops zu verändern sind, dass die einzustellenden Bildqualitätsmerkmale sich ergeben. Nicht nur die Einlernphase eines Benutzers zur Bedienung des Rastermikroskops kann somit in vorteilhafter Weise verkürzt werden, sondern es kann auch die gesamte Bedienung bzw. Einstellphase des Rastermikroskops 25 benutzerfreundlicher gestaltet werden. Letztendlich gibt der Benutzer ein, wie sich das aufgenommene Bild im konkreten Fall hinsichtlich seiner Bildqualitätsmerkmale verändern soll. Nach einer Umrechnung in Systemparameter des Rastermikroskops kann bei erneuter Bildaufnahme die gewünschte Bildverbesserung erzielt werden.

30

Ganz allgemein ist unter dem Begriff Bildqualitätsmerkmal eine Eigenschaft zu verstehen, die die Qualität oder die Aufnahmeart des aufgenommenen Bilds betrifft. Die Veränderung der Qualität des aufgenommenen Bilds wird hierbei durch einen, gegebenenfalls durch mehrere veränderte Systemparameter des

Rastermikroskops bei erneuter Bildaufnahme bewirkt. So könnte ein Bildqualitätsmerkmal das Rauschen der Bilddaten eines detektierten Bilds sein, wobei das Rauschen in der Regel zu verringern sein wird. Das Signal-Rausch-Verhältnis der detektierten Bilddaten ist ebenfalls ein Bildqualitätsmerkmal, das insbesondere bei der Fluoreszenzmikroskopie dann relevant ist, wenn lediglich kleine Objektbereiche mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind und das hiervon detektierte Signal einen Wert aufweist, der nahe am Rauschlimit ist und daher kaum detektierbar bzw. wahrnehmbar ist. In solchen Fällen ist das Signal-Rausch-Verhältnis entsprechend zu erhöhen. In diesem Zusammenhang ist auch das Ausbleichverhalten einer Fluoreszenzmarkierung eines Objekts als Bildqualitätsmerkmal ein Faktor, der von einem Benutzer erkennbar und somit veränderbar ist.

Bei manchen Applikationen kann es erforderlich sein, dass die Detektionsgeschwindigkeit des zu detektierenden Bilddatensatzes erhöht werden muss, da beispielsweise das Objekt sich – wenn auch langsam – relativ zum Objektiv bewegt. Ein weiteres Bildqualitätsmerkmal ist beispielsweise der Kontrast eines detektierten Bilds, der entweder zu erhöhen oder zu verringern ist. In diesem Zusammenhang ist auch der Gamma-Wert ein Bildqualitätsmerkmal, der ebenfalls entsprechend im Rahmen einer Gammakorrektur zu erhöhen oder zu verringern ist. Falls die Auflösung der detektierten Bilddaten nicht ausreichend ist, kann die Auflösung als Bildqualitätsmerkmal durch Benutzereingabe erhöht werden. Ganz allgemein sind als Bildqualitätsmerkmal all diejenigen Merkmale denkbar, die anhand der detektierten Bilddaten mittelbar oder unmittelbar erkennbar sind und die der Benutzer verändern möchte.

Ein Systemparameter des Rastermikroskops kann insbesondere die Leistung einer Lichtquelle, die Wellenlänge einer Lichtquelle, die Rastergeschwindigkeit einer Rastereinheit, der Durchmesser einer konfokalen Detektionslochblende, die Verstärkerkennlinie eines konfokalen Detektors oder die Anzahl der zur Mittelung eines Bilds zu detektierenden Einzelbilder sein.

So könnte die Leistung einer Lichtquelle dann erhöht werden, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis der detektierten Bilddaten verändert werden soll

oder das Ausbleichverhalten einer Fluoreszenzmarkierung eines Objekts dies erlaubt. Als Lichtquelle für ein konfokales Rastermikroskop dient üblicherweise eine Laserlichtquelle, die Licht einer oder mehrerer Wellenlängen emittiert. Die Leistung einer Laserlichtquelle kann mit Hilfe eines zwischen der 5 Laserlichtquelle und dem Rastermikroskop angeordneten AOTF (Acousto-Optical-Tunable-Filter) schnell und effektiv variiert werden. Die Veränderung der Wellenlänge einer Lichtquelle ist insbesondere bei der Detektion von Fluoreszenzmarkierungen eines Objekts erforderlich, wenn bestimmte Fluoreszenzmarkierungen mit einer anderen Wellenlänge besser anregbar 10 sind. Bei dem konfokalen Rastermikroskop könnte eine geringe Variation der Wellenlänge einer Laserlichtquelle mit Hilfe eines zwischen der Laserlichtquelle und dem Rastermikroskop angeordneten OPO (Optisch Parametrischer Oszillator) realisiert werden. Mit dem OPO kann aufgrund nichtlinearer optischer Prozesse kontinuierlich nahezu jede Wellenlänge erzeugt werden.

15 Insbesondere bei einem hohen Ausbleichverhalten einer Fluoreszenzmarkierung könnte die Rastergeschwindigkeit der Rastereinheit des Rastermikroskops erhöht werden. Üblicherweise dient als Rastereinheit eines konfokalen Rastermikroskops ein oder mehrere im Beleuchtungsstrahlengang angeordnete Scanspiegel, die durch Drehung bzw. Verkippung den Beleuchtungsstrahl derart ablenken, dass der Beleuchtungsfokus in der Fokalebene des Objektivs das Objekt – vorzugsweise mäanderförmig – abrastert. Der Durchmesser einer konfokalen Detektionslochblende könnte 20 dann zu vergrößern sein, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis der detektierten Bilddaten zu gering ist. Bei einem konfokalen Rastermikroskop ist der Durchmesser der konfokalen Detektionslochblende direkt proportional zu dem Objektvolumen in der Fokusebene des Mikroskopobjektivs, aus dem reflektiertes oder gestreutes Anregungslicht bzw. Fluoreszenzlicht detektiert wird. In diesem Zusammenhang könnte auch die Verstärkerkennlinie eines 25 konfokalen Detektors zu variieren sein. Üblicherweise wird bei einem konfokalen Rastermikroskop das Detektionslicht mit Hilfe eines dem Detektor zugeordneten Photomultipliers (PMT) detektiert. Die Verstärkerkennlinie eines solchen Detektors wird beispielsweise dadurch verändert, dass die am PMT 30 anliegende Hochspannung entsprechend verändert wird.

Ganz allgemein kann ein eingegebenes Bildqualitätsmerkmal bei der Umrechnung in Systemparameter des Rastermikroskops mehrere Systemparameter des Rastermikroskops beeinflussen bzw. verändern. So könnte beispielsweise bei der Verringerung des Bildqualitätsmerkmals 5 "Rauschen" der detektierten Bilddaten die Rastergeschwindigkeit der Rastereinheit verringert und die Anzahl der zur Mittelung eines Ergebnisbilds zu detektierenden Einzelbilder erhöht werden. In diesem Fall können also 10 zwei unterschiedliche Systemparameter des konfokalen Rastermikroskops verändert werden. In welchem Maß die beiden Systemparameter untereinander zu verändern sind, kann beispielsweise anhand im Steuerrechner abgespeicherter Erfahrungswerte – z.B. im Rahmen eines Expertensystems – bestimmt werden.

Ganz allgemein ist vorgesehen, dass dem Benutzer die tatsächlich 15 eingestellten Systemparameter des Rastermikroskops nicht ausgegeben bzw. angezeigt werden. Dennoch kann es in Einzelfällen erforderlich sein, dass die vom Steuerrechner des Rastermikroskops errechneten und aktuell eingestellten Systemparameter dem Benutzer zur Information ausgegeben und/oder angezeigt werden. In ganz besonders vorteilhafter Weise kann eine 20 solche Ausgabe bzw. Anzeige der aktuell eingestellten Systemparameter im Rahmen eines Lernprogramms zur Bedienung des Rastermikroskops genutzt werden. Hierbei erhält nämlich der Benutzer eine Rückmeldung, welche Systemparameter zu verändern sind, um die jeweiligen Auswirkungen – das zu verändernde Bildqualitätsmerkmal – bei einer neuen Bildaufnahme zu 25 bewirken. Das Ziel eines solchen Lernprogramms könnte es sein, dass der Benutzer letztendlich lernt, unmittelbar die Systemparameter des Rastermikroskops einzustellen:

In bevorzugter Weise wird dem Benutzer für die aktuell gewählten 30 Bildqualitätsmerkmale die bei der bevorstehenden Bildaufnahme voraussichtlich erzielbare Bildqualität errechnet und ausgegeben und/oder angezeigt. Hierbei kann die Berechnung der erzielbaren Bildqualität von den neu einzustellenden Systemparametern ausgehen, die aufgrund der vom Benutzer gewünschten und zu veränderten Bildqualitätsmerkmalen in einen neuen 35 Systemparametersatz umgerechnet wurde. Bei dieser Berechnung kann

einerseits auf reinen physikalische Zusammenhänge abgestellt werden – beispielsweise erzeugt bei einer gewählten Auflösung und einer bestimmten Rasterdichte ein detektiertes Bild "Oversampling", d.h. Bilddatenredundanzen werden erzeugt –, andererseits kann ebenfalls auf im Steuerrechner abgespeicherte Erfahrungswerte – beispielsweise im Rahmen eines Expertensystems – zurückgegriffen werden. Vorzugsweise erfolgt die Anzeige bzw. Ausgabe der voraussichtlich erzielbaren Bildqualität graphisch, insbesondere farbig. So könnte beispielsweise ein Bereich der Benutzeroberfläche des Rastermikroskops in Form einer Ampel ausgeführt sein, bei 5 der das rote Licht aufleuchtet, wenn die gewählte Systemparametereinstellung widersprüchlich ist oder zu Informationsverlusten führt. Ein gelbes Licht könnte dann aufleuchten, wenn die errechneten Systemparameter bei der bevorstehenden Bildaufnahme Artefakte erzeugen. Ein grünes Licht könnte dann aufleuchten, wenn die gewählte Systemparametereinstellung sinnvoll 10 erscheint. Insoweit ist in besonders vorteilhafter Weise eine erfolgreiche Bedienung eines Rastermikroskops nahezu ohne jegliche Kenntnisse der physikalischen bzw. technischen Auswirkungen der einzustellenden Systemparameter möglich. Darüber hinaus kann durch diese Maßnahme der 15 Aufnahmevergang mit dem Rastermikroskop dahingehend beschleunigt werden, dass "Falschaufnahmen" zumindest weitgehend vermieden werden.

Im Konkreten könnte vorgesehen sein, dass dem Benutzer die noch 20 voraussichtlich detektierbare Anzahl der Bilder des gleichen Objekts ausgegeben und/oder angezeigt wird, vorzugsweise bei den aktuell eingestellten Systemparametern bzw. bei der gewünschten Bildqualität. Dies 25 ist insbesondere bei der Bildaufnahme fluoreszenzmarkierter Objekte mit einem konfokalen Rastermikroskop hilfreich, da mit jeder weiteren Bildaufnahme der Fluoreszenzfarbstoff ausbleichen kann und somit die Bildaufnahmen unbrauchbar werden können. Von ganz besonderem Vorteil ist dies 30 dann, wenn von einem fluoreszenzmarkierten Objekt ein dreidimensionaler Bilddatensatz aufgenommen werden soll, wobei aufgrund des Ausbleichverhaltes des Fluoreszenzfarbstoffs jedoch damit zu rechnen ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff schon vor Beendigung der Aufnahme des dreidimensionalen Bilddatensatzes augeblichen ist. Bei der Berechnung der noch

voraussichtlich detektierbaren Anzahl der Bilder des gleichen Objekts könnten die bislang detektierten Bilder dieses Objekts unter Berücksichtigung der bei der jeweiligen Detektion vorgelegenen Systemparametereinstellungen berücksichtigt werden. Insbesondere wenn hierbei Methoden der digitalen Bildverarbeitung angewandt werden, kann hierdurch eine verbesserte Prognose zur Anzahl der noch möglichen Bildaufnahmen angegeben werden. So könnten beispielsweise die gleichen Bildbereiche unterschiedlicher Bildaufnahmen mit gleicher Farbmarkierung auf ihre mittlere Intensität hin mit dem Ziel untersucht werden, das Ausbleichverhalten des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs zu bestimmen. Hierbei wird die jeweilige Systemparametereinstellung bei der jeweiligen Bildaufnahme berücksichtigt.

Ganz allgemein ist vorgesehen, dass die vom Benutzer eingegebenen Bildqualitätsmerkmale mit einer herkömmlichen Eingabeeinheit des Steuerrechners des Rastermikroskops erfolgt, also beispielsweise mit einer Computertastatur und/oder einer Maus. Zur Vereinfachung und/oder zur Beschleunigung des Eingabevorgangs der Bildqualitätsmerkmale könnte jedoch vorgesehen sein, dass jedes Bildqualitätsmerkmal mit einem dafür vorgesehenen Bedienelement eingestellt bzw. verändert wird. Hierbei könnte beispielsweise ein Joystick oder ein Trackball als Bedienelement dienen, wobei der Joystick mehrere Tastenelemente aufweisen könnte. Zur Veränderung eines Bildqualitätsmerkmals könnte der Benutzer beispielsweise eine entsprechende Taste des Joysticks drücken und gedrückt halten und dabei den Joystick nach links oder rechts auslenken, wodurch die Veränderung des der Taste zugeordneten Bildqualitätsmerkmals bewirkt wird.

Alternativ oder zusätzlich wird die eingangs genannte Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 11 gelöst. Hiernach ist das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass der Benutzer nach einer Bildaufnahme des Objekts mindestens einen Systemparameter des Rastermikroskops verändert, dass dann eine Bildaufnahme bei verändertem Systemparameter bzw. veränderten Systemparametern simuliert wird und dass das Simulationsergebnis dem Benutzer ausgegeben und/oder angezeigt wird.

Die hiermit verfolgte Strategie der Einstellung der Systemparameter des Rastermikroskops beruht darauf, dass bei einer Veränderung der Systemparameter nach einer erfolgten Bildaufnahme – anstatt wie 5 üblicherweise ein neues Bild bei veränderten Systemparametern aufzunehmen – zunächst eine Bildaufnahme bei verändertem Systemparameter simuliert wird, also bei diesem Verfahrensschritt noch keine weitere Bildaufnahme erfolgt. Hierdurch wird in ganz besonders vorteilhafter Weise das zu detektierende Objekt nicht durch eine weitere Bildaufnahme 10 belastet. Der Benutzer erhält vielmehr ein simuliertes Bild des bereits detektierten Objekts bei einer veränderten Systemparametereinstellung, wobei er nun entscheiden kann, ob das Objekt bei der nun vorliegenden, der Simulation zugrunde liegenden Systemparametereinstellung erneut mit dem Rastermikroskop aufgenommen werden soll. Falls nicht, wird der Benutzer 15 mindestens einen weiteren Systemparameter variieren und die Verfahrensschritte wiederholen sich. In ganz besonders vorteilhafter Weise könnte vorgesehen sein, dass zur Veränderung der Systemparameter des Rastermikroskops vor einer Simulation einer Bildaufnahme der Benutzer ein Bildqualitätsmerkmal eingibt, das in mindestens einen verändert 20 einzustellenden Systemparameter des Rastermikroskops umgerechnet wird. Insoweit könnten die Verfahrensschritte gemäß den Patentansprüchen 1 bis 10 mit dem Verfahren gemäß Patentanspruch 11 kombiniert werden, beispielsweise dahingehend, dass eine Systemparameterveränderung durch 25 Eingabe und Umrechnung von Bildqualitätsmerkmalen bewirkt wird.

Die Simulation könnte den optischen Abbildungsvorgang des Rastermikroskops umfassen, wobei die Simulation vorzugsweise von dem Bild des bereits detektierten Objekts ausgeht. Zur Simulation des optischen Abbildungsvorgangs des Rastermikroskops könnten die Abbildungseigenschaften des Rastermikroskops einbezogen werden, die entweder 30 experimentell bestimmt wurden oder durch eine mathematische Beschreibung vorgegeben sind, die das tatsächliche Abbildungsverhalten des Rastermikroskops hinreichend genau beschreibt. Eine solche mathematische Beschreibung könnte beispielsweise die optische Übertragungsfunktion des

Rastermikroskops in Form der dreidimensionalen Punktbildfunktion, der Point-Spread-Function darstellen. Falls die Simulation von dem bereits detektierten Bild des Objekts ausgeht, wird im Rahmen der Simulation lediglich errechnet, welchen Einfluss die veränderten Systemparameter auf eine weitere Detektion desselben Objekts ausüben.

Anhand des Simulationsergebnisses kann der Benutzer entscheiden, ob eine weitere Bildaufnahme mit dem Rastermikroskop mit den nunmehr eingestellten Systemparametern durchgeführt wird oder ob ein zuvor veränderter Systemparameter noch weiter verändert wird und/oder zusätzlich ein anderer Systemparameter zu verändern ist. Insoweit kann der Benutzer durch diese Vorgehensweise ohne zusätzliche tatsächliche Bildaufnahmen solange die Systemparameter des Rastermikroskops verändern, bis – zumindest auf Simulationsbasis – das gewünschte Ergebnisbild ermittelt ist.

Hierdurch kann in ganz besonders vorteilhafter Weise eine Belastung des Objekts durch unnötige bzw. nur zur Einstellung der Systemparameter des Rastermikroskops erforderliche Bildaufnahmen vermieden werden. In weiter vorteilhafter Weise kann auch die Auswirkung der Veränderung der Systemparameter anhand des Simulationsergebnisses im Rahmen eines Lernprogramms zur Bedienung eines Rastermikroskops integriert werden.

Die Simulation der Bildaufnahme bei verändertem Systemparameter könnte auf dem Steuerrechner des Rastermikroskops und/oder auf einem damit verbundenen weiteren Rechner bzw. Computer erfolgen. Insbesondere bei rechenaufwendigen Simulationsberechnungen könnte es erforderlich sein, dass die Berechnungen auf mehrere Rechner verteilt werden, so dass der Steuerrechner des Rastermikroskops mit der Simulationsrechnung nicht überlastet wird. Der oder die zusätzlichen Rechner könnten beispielsweise über ein Netzwerk mit dem Steuerrechner des Rastermikroskops verbundenen sein, wobei auf bereits bestehende Netzwerkprotokolle sowie auf Parallelisierungsprogramme aufgebaut werden könnte.

Für den Fall, dass das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Patentanspruch 1 und/oder Patentanspruch 11 im wesentlichen im Rahmen des Steuerprogramms des Rastermikroskops realisierbar ist, könnten bereits bestehende

bzw. ausgelieferte Rastermikroskope mit dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgerüstet werden. Insoweit ist mit Patentanspruch 15 eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung beansprucht, nämlich ein Rastermikroskop, vorzugsweise ein konfokales Rastermikroskop, 5 zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Patentansprüche 1 bis 14. Zur Vermeidung von Wiederholungen wird auf den allgemeinen Teil der Beschreibung verwiesen.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung 10 in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den nebengeordneten Patentansprüchen 1 und 11 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten 15 Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

20 Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Ablaufdiagramms eines ersten Ausführungsbeispiels des erfindungsgemäßen Verfahrens,

25 Fig. 2 eine schematische Darstellung einer Bedien- und Ausgabe- konsole des Steuerprogramms eines konfokalen Raster- mikroskops zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens,

30 Fig. 3 eine schematische Darstellung eines Ablaufdiagramms eines zweiten Ausführungsbeispiels des erfindungsgemäßen Verfahrens,

Fig. 4a eine schematische Darstellung eines detektierten Bilds eines Objekts bei einer vorgegebenen Systemparametereinstellung,

Fig. 4b eine schematische Darstellung eines simulierten Bilds bei einer zu veränderten Systemparametereinstellung ausgehend vom Bild aus Fig. 4a und

5

Fig. 4c eine schematische Darstellung eines weiteren simulierten Bilds bei einer zu Fig. 4b weiter veränderten Systemparameter-einstellung.

10 Fig. 1 zeigt ein Ablaufdiagramm eines ersten Ausführungsbeispiels des vorliegenden Verfahrens zur Einstellung der Systemparameter eines konfokalen Rastermikroskops. Die mit dem Rastermikroskop durchgeführte Bildaufnahme eines Objekts wird von einem Steuerrechner gesteuert, wobei der Verfahrensschritt einer ersten Bildaufnahme in dem Ablaufdiagramm aus 15 Fig. 1 mit dem Bezugszeichen 1 gekennzeichnet ist. Dieser Bildaufnahme wird ein vorgegebener Systemparametersatz zugrunde gelegt.

Erfindungsgemäß gibt der Benutzer in dem im Ablaufdiagramm aus Fig. 1 gezeigten Verfahrensschritt mit dem Bezugszeichen 2 mindestens ein 20 Bildqualitätsmerkmal ein. Gemäß Verfahrensschritt 3 wird das eingegebene Bildqualitätsmerkmal bzw. die eingegebenen Bildqualitätsmerkmale in verändert einzustellende Systemparameter umgerechnet. Mit dem Verfahrensschritt 4 wird ein weiteres Bild mit dem konfokalen Rastermikroskop bei umgerechneten, veränderten Systemparametern aufgenommen. Im Verfahrensschritt 5 entscheidet der Benutzer, ob das Bild nach 25 der Datenaufnahme unter veränderten Systemparametern den Anforderungen des Benutzers genügt. Ist dies nicht der Fall, so erfolgen gemäß Verzweigung 6 die Verfahrensschritte 2 bis 5 erneut. Im anderen Fall endet das Verfahren zur Einstellung der Systemparametern des konfokalen Rastermikroskops 30 gemäß Verzweigung 7 mit dem Verfahrensschritt 8.

Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung einer Bedien- und Ausgabekonsole des Steuerprogramms des konfokalen Rastermikroskops zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Hierbei sind links drei

Schiebebalken 9 gezeigt, die jeweils zur Einstellung eines Bildqualitätsmerkmals dienen. Die Schiebebalken 9 umfassen Pfeilsymbole 10, die den Wert der aktuell eingestellten Bildqualitätsmerkmale anzeigen und mit Hilfe derer das jeweilige Bildqualitätsmerkmal veränderbar ist, beispielsweise mit

5 einem nicht gezeigten Mauscursor. Das jeweils aufgenommene Bild wird im Vorausschaufenster 11 dargestellt. Der Ausgabebereich 12 dient zur Anzeige der umgerechneten bzw. aktuell eingestellten Systemparameter des konfokalen Rastermikroskops bei der jeweiligen Datenaufnahme.

10 Die Anzeige 13 dient zur Ausgabe der voraussichtlich erzielbaren Bildqualität bei den aktuell gewählten bzw. eingestellten Bildqualitätsmerkmalen, bei denen die Bildaufnahme mit dem Rastermikroskop erfolgen soll. Hierbei sind drei unterschiedliche Bereiche 14, 15 und 16 vorgesehenen. Der Bereich 14 leuchtet in roter Farbe auf, wenn die gewählte Systemparametereinstellung

15 voraussichtlich widersprüchlich ist oder zu Informationsverlusten führt. Der Bereich 15 wird mit gelber Farbe ausgefüllt, wenn die gewählte Systemparametereinstellung voraussichtlich Artefakte erzeugt. Eine grüne Anzeige erfolgt im Bereich 16, wenn die gewählte Systemparametereinstellung sinnvoll erscheint.

20 Im Ausgabebereich 12 wird dem Benutzer weiterhin die Anzahl der bei der aktuellen Systemparametereinstellung bzw. bei der gewünschten Bildqualität noch detektierbaren Bilder des gleichen Objekts angezeigt bzw. ausgegeben, bevor das Objekt aufgrund der Bildaufnahme unbrauchbar wird.

25 Fig. 3 zeigt ein Ablaufdiagramm ein weiteres Ausführungsbeispiel des vorliegenden Verfahrens zur Einstellung der Systemparameter eines konfokalen Rastermikroskops. Wie auch bei dem Ablaufdiagramm aus Fig. 1 ist mit dem Bezugszeichen 1 aus Fig. 3 der erste Verfahrensschritt gekennzeichnet, bei dem eine Bildaufnahme bei einem vorgegebenen Systemparametersatz erfolgt. Der mit dem Bezugszeichen 2 gekennzeichnete Verfahrensschritt aus Fig. 3 stellt die Eingabe bzw. die Veränderung eines Systemparameters oder eines Bildqualitätsmerkmals dar. Der mit dem Bezugszeichen 17 gekennzeichnete Verfahrensschritt umfasst die Simulation

30 einer Bildaufnahme bei einem veränderten Systemparameter bzw.

35 einer Bildaufnahme bei einem veränderten Systemparameter bzw.

Bildqualitätsmerkmal. Hierbei wird der optische Abbildungsvorgang des konfokalen Rastermikroskops numerisch und ausgehend von dem mit Verfahrensschritt 1 detektierten Bild in Verbindung mit der optischen Übertragungsfunktion des konfokalen Rastermikroskops simuliert. Mit dem 5 Verfahrensschritt 18 wird dem Benutzer das Simulationsergebnis des Verfahrensschritts 17 in dem Vorausschaufenster 11 aus Fig. 2 angezeigt. In dem Verfahrensschritt 5 aus Fig. 3 entscheidet der Benutzer, ob das simulierte Bild seinen Anforderungen genügt. Falls ja, erfolgt eine weitere Bildaufnahme mit dem konfokalen Rastermikroskop bei veränderten 10 Systemparametern gemäß Verzweigung 19 im Verfahrensschritt 20. Hierzu betätigt der Benutzer das Betätigungsfeld 23 aus Fig. 2, beispielsweise mit einem nicht gezeigten Mauscursor. In allen anderen Fällen werden gemäß Verzweigung 21 die Verfahrensschritte 2, 17, 18 und 5 erneut durchlaufen.

15 Die Figuren 4a bis 4c zeigen unterschiedliche Bildaufnahmen dreier Objekte 22, wobei die drei Objekte 22 mehrmals aufgenommen wurden. Das in Fig. 4a gezeigte Bild ist gemäß Verfahrensschritt 1 aus Fig. 1 bei einem vorgegebenen Systemparametersatz aufgenommen worden. Nachdem der Benutzer gemäß Verfahrensschritt 2 aus Fig. 1 das Bildqualitätsmerkmal 20 "Kontrast" erhöht hat, wurde gemäß Verfahrensschritt 4 aus Fig. 1 das in Fig. 4b gezeigte Bild aufgenommen. Hierbei ist der Systemparameter "Hochspannung des PMT" erhöht worden. Mit der verglichen zu Fig. 4a dargestellten dichteren Punktierung der Objekte 22 in Fig. 4b ist lediglich schematisch angedeutet, dass nun der Bildkontrast tatsächlich erhöht ist. 25 Nachdem der Benutzer das Bildqualitätsmerkmal "Kontrast" abermals erhöht hat, wurde das in Fig. 4c gezeigte Bild aufgenommen. Lediglich schematisch ist angedeutet, dass die drei Objekte 22 eine noch dichtere Punktierung aufweisen, was letztendlich einem höheren Bildwert bzw. Grauwert entspricht. Die Punktierung des Bildhintergrunds 24 des in Fig. 4c gezeigten Bilds deutet 30 an, dass nunmehr der Rauschanteil zu groß ist, also eine erneute Variation der Systemparameter gemäß den Verfahrensschritten 2 bis 5 aus Fig. 1 erforderlich ist.

Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

Bezugszeichenliste

- 1 Aufnahme eines ersten Bilds bei einem vorgegebenen Systemparametersatz
- 2 Eingabe von Bildqualitätsmerkmalen durch den Benutzer
- 3 Umrechnung der Bildqualitätsmerkmale in Systemparameter
- 4 Aufnahme eines weiteren Bilds bei veränderten Systemparametern
- 5 Entscheidung des Benutzers, ob das mit (4) detektierte Bild den Anforderungen genügt
- 6 Verzweigung zu Verfahrensschritt 2
- 7 Verzweigung zu Verfahrensschritt 8
- 8 Ende des Verfahrens zur Einstellung der Systemparameter des konfokalen Rastermikroskops
- 9 Schieberegler
- 10 Pfeilsymbol
- 11 Vorausschaufenster
- 12 Ausgabebereich
- 13 Anzeige
- 14 roter Bereich von (13)
- 15 gelber Bereich von (13)
- 16 grüner Bereich von (13)
- 17 Simulation einer Bildaufnahme bei veränderten Systemparametern

- 18 Anzeige des Simulationsergebnisses für den Benutzer
- 19 Verzweigung zu Verfahrensschritt 20
- 20 Bildaufnahme mit dem konfokalen Rastermikroskop bei veränderten Systemparametern
- 21 Verzweigung zu Verfahrensschritt 2
- 22 Objekte
- 23 Bestätigungsfeld
- 24 Bildhintergrund

Patentansprüche

1. Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines Rastermikroskops, vorzugsweise eines konfokalen Rastermikroskops, wobei die mit dem Rastermikroskop durchgeführte Bildaufnahme eines Objekts von einem Steuerrechner gesteuert wird,
5 dadurch gekennzeichnet, dass nach einer Bildaufnahme des Objekts von einem Benutzer mindestens ein Bildqualitätsmerkmal eingegeben wird, das von dem Steuerrechner in mindestens einen verändert einzustellenden Systemparameter des Rastermikroskops umgerechnet wird.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Bildqualitätsmerkmal das Rauschen der detektierten Bilddaten oder das Signal-Rausch-Verhältnis der detektierten Bilddaten oder das Ausbleichverhalten einer Fluoreszenzmarkierung eines Objekts oder die Detektionsgeschwindigkeit eines zu detektierenden Bilddatensatzes oder den Kontrast oder die Auflösung betrifft.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Systemparameter des Rastermikroskops die Leistung einer Lichtquelle oder die Wellenlänge einer Lichtquelle oder die Rastergeschwindigkeit einer Rastereinheit oder den Durchmesser einer konfokalen Detektionslochblende oder die Verstärkerkennlinie eines konfokalen Detektors oder die Anzahl der zur Mittelung eines Bilds zu detektierenden Einzelbilder betrifft.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein eingegebenes Bildqualitätsmerkmal bei der Umrechnung in

Systemparameter des Rastermikroskops mehrere Systemparameter des Rastermikroskops beeinflusst.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die von dem Steuerrechner des Rastermikroskops errechneten und aktuell eingestellten Systemparameter dem Benutzer zur Information ausgegeben und/oder angezeigt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass dem Benutzer für die aktuell gewählten Bildqualitätsmerkmale die bei der bevorstehenden Bildaufnahme voraussichtlich erzielbare Bildqualität errechnet und ausgegeben und/oder angezeigt wird, vorzugsweise graphisch, insbesondere farbig.
15. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine farbige Anzeige,
 - in roter Farbe erfolgt, wenn die gewählte Systemparametereinstellung widersprüchlich ist oder zu Informationsverlusten führt,
 - in gelber Farbe erfolgt, wenn die gewählte Systemparameter-einstellung Artefakte erzeugt, oder
 - in grüner Farbe erfolgt, wenn die gewählte Systemparameter-einstellung sinnvoll erscheint.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass dem Benutzer die noch voraussichtlich detektierbare Anzahl der Bilder des gleichen – vorzugsweise fluoreszenzmarkierten – Objekts ausgegeben und/oder angezeigt wird.
25. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass zur Berechnung der noch voraussichtlich detektierbaren Anzahl der Bilder des gleichen Objekts die bislang detektierten Bilder unter Berücksichtigung der bei der jeweiligen Detektion vorgelegenen Systemparametereinstellung berücksichtigt werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Bildqualitätsmerkmal mit einem dafür vorgesehenen Bedienelement eingestellt wird, beispielsweise mit einem Joystick oder einem Trackball.
- 5 11. Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines Rastermikroskops, vorzugsweise eines konfokalen Rastermikroskops, wobei die mit dem Rastermikroskop durchgeführte Bildaufnahme eines Objekts von einem Steuerrechner gesteuert wird, vorzugsweise nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
- 10 dadurch gekennzeichnet, dass der Benutzer nach einer Bildaufnahme des Objekts mindestens einen Systemparameter des Rastermikroskops verändert, dass dann eine Bildaufnahme bei verändertem Systemparameter bzw. veränderten Systemparametern simuliert wird und dass das Simulationsergebnis dem Benutzer ausgegeben und/oder angezeigt wird.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Simulation den optischen Abbildungsvorgang des Rastermikroskops umfasst und vorzugsweise von dem Bild des bereits detektierten Objekts ausgeht.
- 20 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Benutzer eine weitere Bildaufnahme mit dem Rastermikroskop bei veränderten Systemparametern durchführen lässt oder mindestens einen weiteren Systemparameter verändert.
- 25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Simulation auf dem Steuerrechner des Rastermikroskops und/oder auf einem damit verbundenen weiteren Rechner erfolgt.
15. Rastermikroskop, vorzugsweise konfokales Rastermikroskop, zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Einstellung der Systemparameter eines Rastermikroskops, vorzugsweise eines konfokalen Rastermikroskops, wobei die mit dem Rastermikroskop durchgeführte Bildaufnahme eines Objekts von einem Steuerrechner gesteuert wird, und ist dadurch gekennzeichnet, dass nach einer Bildaufnahme des Objekts von einem Benutzer mindestens ein Bildqualitätsmerkmal eingegeben wird, das von dem Steuerrechner in mindestens einen verändert einzustellenden Systemparameter des Rastermikroskops umgerechnet wird. Alternativ oder zusätzlich ist das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass der Benutzer nach einer Bildaufnahme des Objekts mindestens einen Systemparameter des Rastermikroskops verändert, dass dann eine Bildaufnahme bei verändertem Systemparameter bzw. veränderten Systemparametern simuliert wird und dass das Simulationsergebnis dem Benutzer ausgegeben und/oder angezeigt wird.

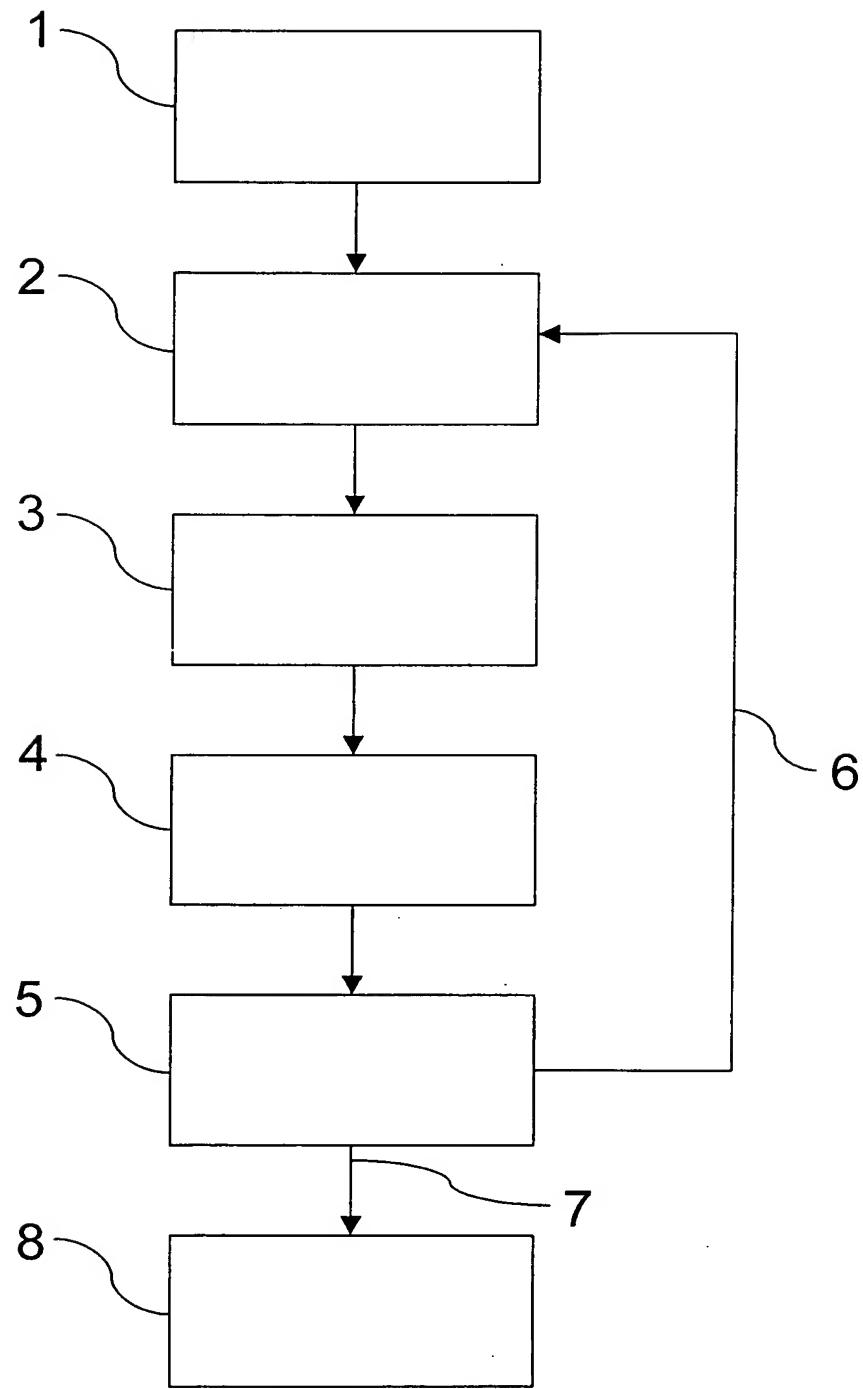
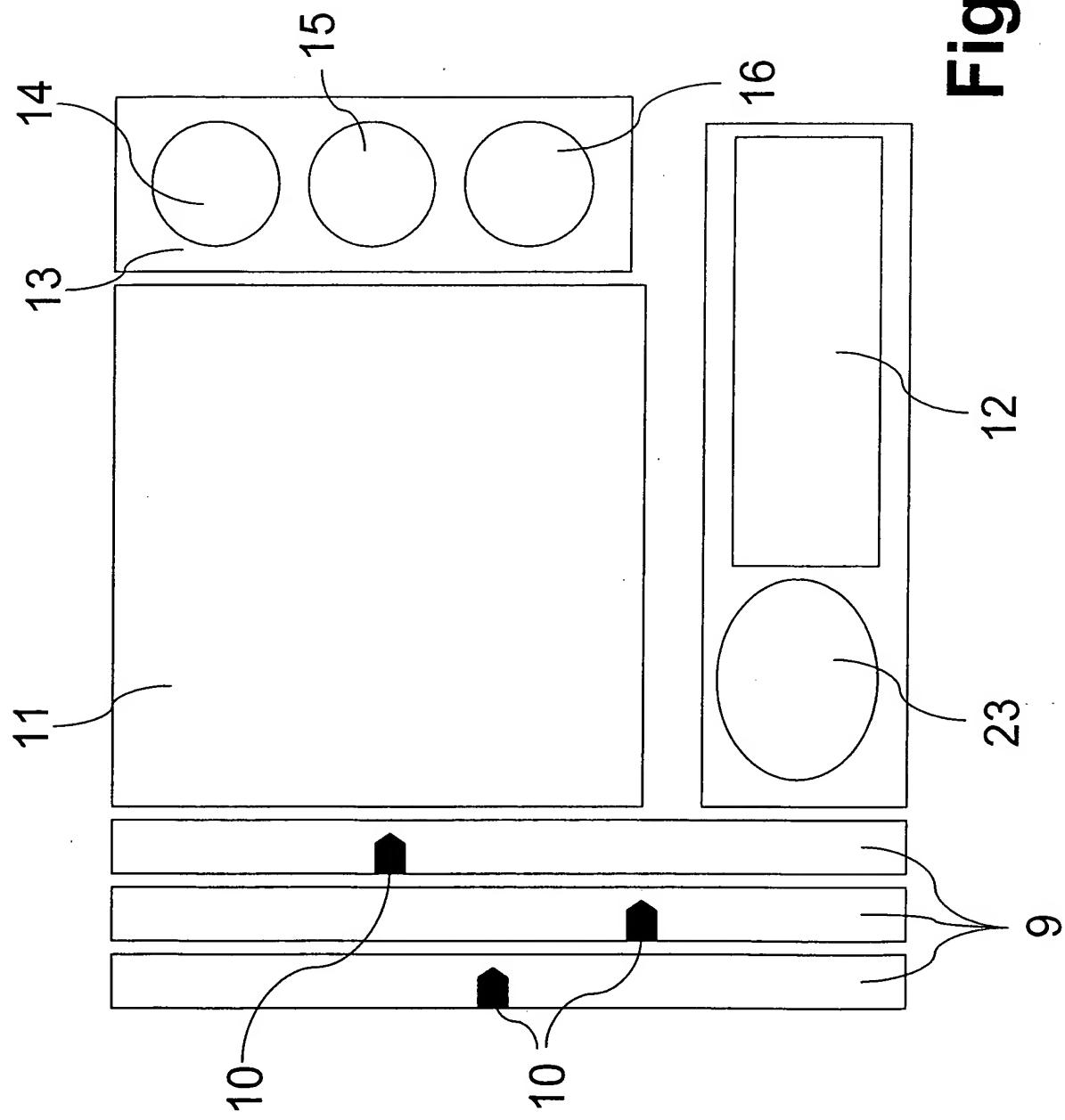


Fig. 1

Fig. 2



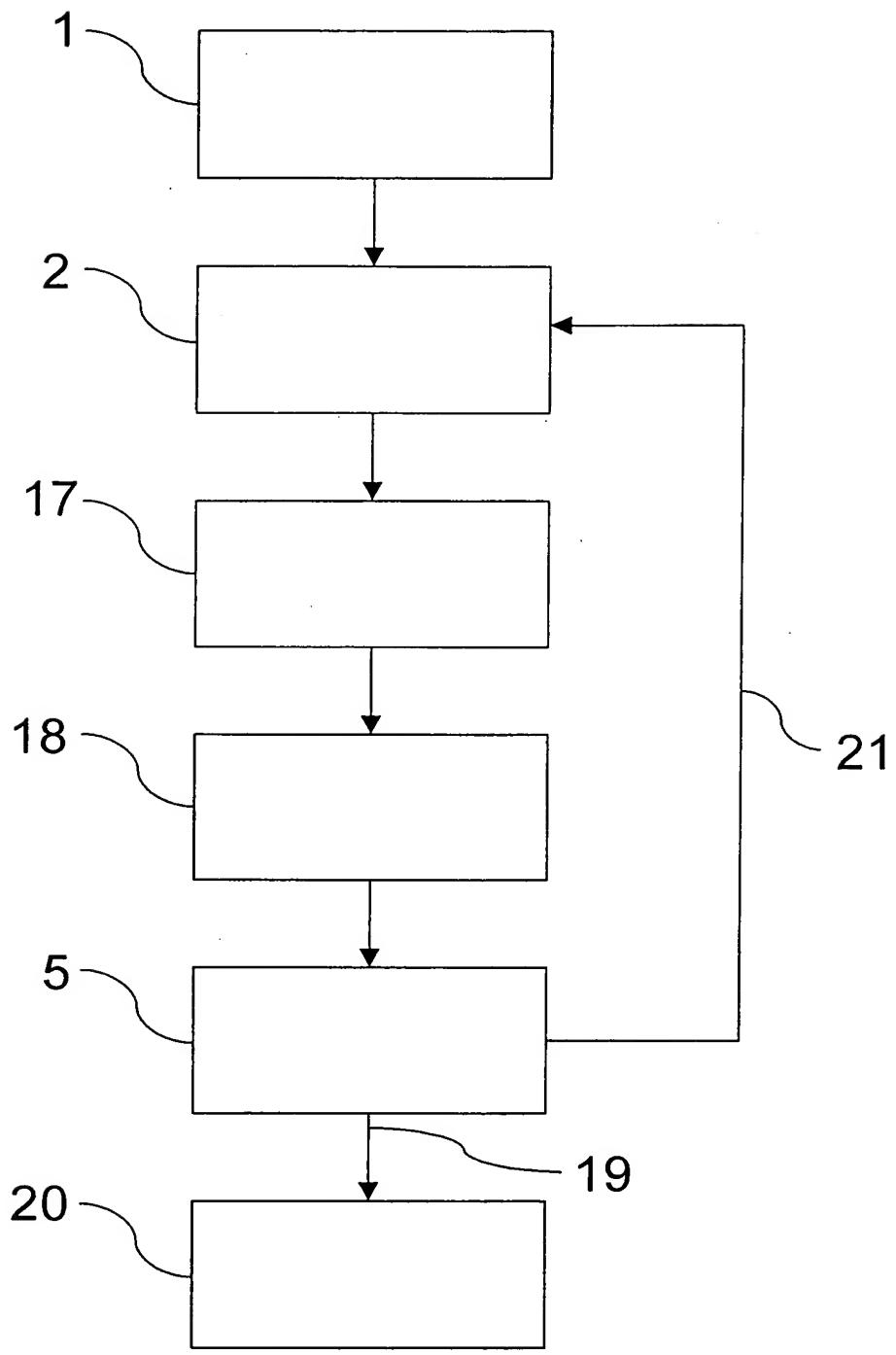


Fig. 3

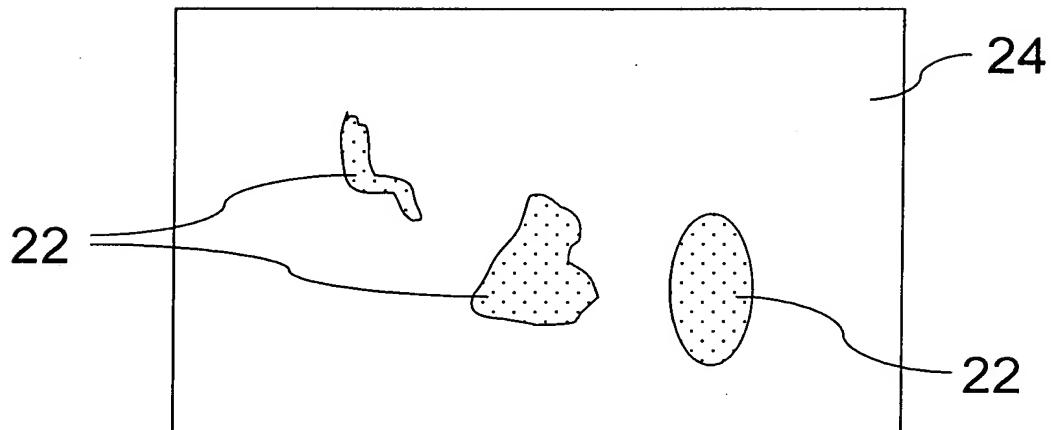


Fig. 4a

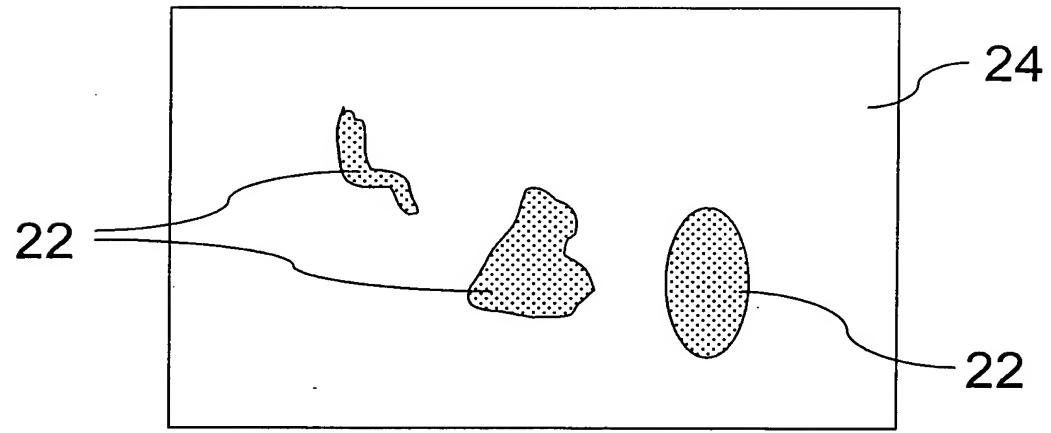


Fig. 4b

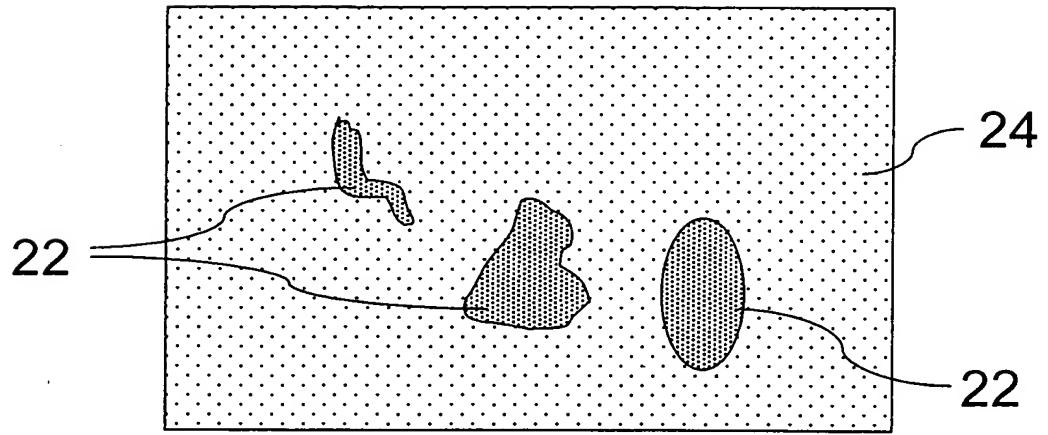


Fig. 4c